

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : **03-007571**

(43) Date of publication of application : **14.01.1991**

(51) Int.Cl. **C12M 1/00**

C12N 15/10

C12Q 1/68

(21) Application number : **02-022293**

(22) Date of filing : **02.02.1990**

(71) Applicant : **EASTMAN KODAK CO**

(72) Inventor : **SCHNIPELSKY PAUL N
SEABERG LEONARD J
WELLMAN JEFFREY ALLEN
HINCKLEY CHARLES CULLIS
DONISH WILLIAM H
FINDLAY JOHN B**

(30) Priority

Priority number : **89 306735** Priority date : **03.02.1989** Priority country : **US**
89 339923 **17.04.1989** **US**

(54) CONTAINMENT CUVETTE FOR PCR AND USAGE THEREOF

(57) Abstract:

PURPOSE: To amplify and detect a nucleic acid material without contaminating the environment by combining a reaction chamber containing the nucleic acid material and amplification reagents, a circulating means, housing chamber(s), and a means for linking compartment wall fluid-fashion together so as to make a specific action.

CONSTITUTION: In this disposable type, closed curvette designed to conduct the amplification and detection of a nucleic acid material, there are equipped a plurality of compartments including a reaction chamber containing the nucleic acid and amplification reagents, a means for actively or passively circulating the contents in the reaction chamber via temperature of about 30 to 95°C, at least one housing chamber situated in close proximity to the reaction chamber so as to be used together with at least one detection material, and a means for mutually linking the compartments in a specified order fluid-fashion when a pressure is applied to the contents in the reaction chamber; wherein at least one of the compartments is provided with a means for immobilizing the nucleic acid material for the purpose of its detection after amplification at a detection point therein.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of
rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報 (A)

平3-7571

⑮ Int. Cl.⁵
 C 12 M 1/00
 C 12 N 15/10
 C 12 Q 1/68

識別記号 A
 庁内整理番号 8717-4B
 A 6807-4B

⑯ 公開 平成3年(1991)1月14日

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全23頁)

⑭ 発明の名称 PCR用の封入キュベットおよびその使用方法

⑫ 特願 平2-22293

⑫ 出願 平2(1990)2月2日

優先権主張 ⑬ 1989年2月3日 ⑬ 米国(US) ⑬ 306735

⑭ 発明者 ポール ニコラス シ アメリカ合衆国, ニューヨーク 14607, ロチエスター,
ユニペルスキ カンタベリー ロード 89⑭ 発明者 レオナード ジョセフ アメリカ合衆国, ニューヨーク 14526, ベンフィール
シーバーグ ド, パインビュー ドライブ 46⑭ 発明者 ジエフリー アレン アメリカ合衆国, ニューヨーク 14615, ロチエスター,
ウエルマン ストーン ロード 1544⑮ 出願人 イーストマン コダック アメリカ合衆国, ニューヨーク 14650, ロチエスター,
カンパニー ステイト ストリート 343⑯ 代理人 弁理士 青木 朗 外4名
最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

PCR用の封入キュベットおよびその使用方法

2. 特許請求の範囲

1. 核酸材料の増幅および検出を実施するための閉鎖した、使いすて型のキュベットにおいて、核酸材料と増幅試薬とを含有した反応室を含んだ複数の隔室と、約30°Cから約95°Cの範囲の温度を通じて前記反応室の内容物を能動的に若しくは受動的に循環せしめる手段と、少なくとも一つの検出材料と共に使用するように前記反応室に近接して位置する少なくとも一つの収納室と、圧力が反応室の内容物に印加されたときに前記隔室を所定の順序で相互に流体的に連結する手段とを具備しており、前記隔室は全てキュベットの外側の位置に対して流体に対して閉鎖されており、前記隔室の少なくとも一つはその中の検出地点において増幅の後の検出のため核酸材料を不動にするための手段を具備しており、増幅された核酸の検出を増幅された核酸材料による他のキュベットもし

くは装置の汚染なしに行うことができる特徴とする使いすて型の閉鎖キュベット。

2. 請求項1に記載の発明において、前記反応室は核酸材料、ポリメラーゼ酵素、プライマー核酸およびニュークレオチドを具備している特徴とする使いすて型の閉鎖キュベット。

3. 請求項1に記載の発明において、前記反応室は核酸材料、TAQポリメラーゼ、プライマー核酸およびニュークレオチドを具備している特徴とする使いすて型の閉鎖キュベット。

4. DNAを増幅および検出する装置において、
(1) 複数の隔室と、これを少なくとも一つの他の隔室に相互に製造するための手段とを有するキュベットを有し、該キュベットは(a)DNAストランドを増幅するための少なくとも一つの反応室と、(b)増幅されたDNAを検出し、検出地点を具備する少なくとも一つの検出室と、(c) 検出された材料を増幅されたDNAストランドに伝達する手段とを備え、(ii)約30°Cから約90°Cの温度範囲を通して反応室の内容物の積極的若しくは受動的な循環

を許容する手段を具備し、(iii) 増幅のためサンプルDNAを前記反応室に対する注入を許容するため、前記少なくとも一つの反応室にのみ連結される液体アクセス手段を具備し、(iv)サンプルDNAの注入の後にDNAの通過に対して前記キュベットを遮断する手段を具備し、更に少くとも検出材料およびDNAストランドを検出室において検出部位に移動する手段を具備し、一旦DNAサンプルが隔壁に導入されアクセス開口が閉鎖されると、隔壁内の流体内容物は運転者及び環境との接触が起こらないように増幅期間及び検出反応の全期間は拘束されることを特徴とする装置。

5. 請求項4に記載の発明において、前記移動手段は前記キュベット中に取り付けされたピストンより成り、かつピストンは、該ピストンの移動時に前記検出材料及びDNAストランドをして前記検出地点に向け動くよう付勢するべく構成される通路により連結されてることを特徴とする装置。

6. 請求項5に記載の発明において、前記移動手段は前記キュベット中に設けたピストンを更に

具備し、該ピストンは通路によって前記検知地点に流体的に連結される第2のピストンを具備し、第2のピストンが収縮したときに前記検知地点での圧力を緩和することができることを特徴とする装置。

7. 環境を汚染するエーロゾルが外部に流出することを許容することなしに閉鎖キュベットにおいて核酸材料を増幅しつつ検出する方法において、(a)核酸材料のサンプルをキュベットに注入し、該キュベットは、増幅試薬が存在する反応室と、検知材料と共に使用する収納室と、検知地点を含む少なくとも一つの室とを含む多数の隔壁並びに流体の伝達を行わしめるため前記隔壁を相互に連結する手段を具備し、(b)核酸材料を包含する前記キュベットの部分を恒久的に遮断し、全ての核酸をそのキュベットに封入し、(c)前記試薬が有効となる所定の温度変化にわたってキュベットを循環させることにより核酸材料を増幅し、(d)増幅された核酸材料を前記反応室から前記検知地点に流体的に搬送し、(e)検知材料を前記検知点に

流体提供に搬送し、並びに(f)前記地点において増幅された核酸材料を前記検知材料と共に検出し、同時に核酸材料は前記キュベット中に封入維持することを特徴とする閉鎖キュベット内の核酸材料の増幅および検出方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

この発明はPCR技術を利用して、核酸の増幅および検出を、増幅された核酸を環境に露出することなく、実施することができるキュベット(cuvette)に関する。

〔従来の技術〕

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はDNA等の、単一の細胞のように小さなものから頻繁に抽出される核酸材料が数億という複製物に増幅されるのを可能とする。これは、PCR技術の開発の前は、単一のDNAのストランドを検出するということは夢にも考えられなかったことであるから、重要なことである。しかしながら、単一のDNAストランド(例えば、ヒトの免疫欠陥ウイルス(HIVといい、

AIDSを引き起すものとして知られている))のDNAが選定されたDNAを増幅する増幅試薬に加えられると、そのDNAの何億という複写物が比較的短期間のうちに得られる。それどころか、増幅された核酸材料(例えばDNA)の検出のため、選定された増幅材料にハイブリッダライズするプローブを使用することを可能とし、そのようなプローブは固体支持体(例えば、フィルタ膜)に固定若しくは固定可能にされており、酵素もしくは他の成分を使用して検出するためラベル(標識)を付けられている。

通常はこれは、封止されたプラスチックコンテナ内で、所望の数の複製が得られるまで、核酸材料を増幅することにより達成される。その後、キュベットは封止を破ることにより再度開けられ、増幅された複写体が取り出され検知装置に送られるか、又は検知剤が増幅を行ったコンテナに印加され、検出は同一のコンテナ内で実施される。

〔発明が解決しようとする課題〕

この方法はPCR技術を簡便に広範に使用するに

は不充分であり、それはエーロゾルが開封若しくは流体の搬送の過程で発生することによる。エーロゾルは増幅された核酸材料（即ちDNA）を幾分含んでいる。そして、エーロゾルは環境中に分散されることになる。環境中のそのような微量の分子についてはあまり注意が払われていなかった。しかしながら、たった一つのDNA分子であっても検出に未使用の他の増幅コンテナを破壊するおそれがある。即ち、オペレータの不注意により、迷出してきたDNA分子が検査の未了のコンテンナに浮遊し、もしくは運ばれてくると、そのたった一つの分子が次の増幅を行わしめるのに必要なDNAとなる。言うまでもないことであるが、次の試験のポイントで特定のDNAが存在しているのが（例えばHIVの存在）分かったら、そしてこれが迷出DNAが原因であり、患者のそれが原因でないことが分かっただけで、その試験は無駄になってしまふことになる。即ち、DNA複製の能力が高いことが誤試験の主たる原因となるのである。実際問題としてどの研究施設でも、サンプルが既に増幅さ

れたコンテナの封止がされていないことが汚染の原因であることが認められている。そのような問題は熟練度の高い人を使用し、エーロゾルの発生を最小となるように努力することで、避けることはできようが、そのような熟練労働が必要なことはこの技術を一般的な応用するためには障害となる。

従って、この発明の目的は、周囲の環境を汚染することなく核酸材料の増幅及び検出を行うことができる装置及び方法を提供することにある。

この発明の他の目的は検知工程を自動化し、オペレータの介入の必要性を最小とすることにある。増幅した核酸材料を運搬したり、検知試薬を印加したるすることは自動化を困難とするものである。
〔課題を解決するための手段〕

この発明は次のことを基本解決原理とするもので、それは、どのような増幅核酸材料といえどもこれが逃れることができないようにキュベットに増幅試薬及び増幅核酸を閉じ込めておくことにより汚染を防止することができるということである。

更に特定すると、この発明の目的を達成する、この発明の一つの実現形態である、核酸材料の増幅および検出を実施するための閉鎖した、使い捨て型のキュベットは、核酸材料と増幅試薬とを含有した反応室を含んだ複数の隔室と、約30°Cから約95°Cの範囲の温度を通じて前記反応室の内容物を能動的に若しくは受動的に循環せしめる手段と、少なくとも一つの検出材料と共に使用するよう前に記反応室に近接して位置する少なくとも一つの収納室と、圧力が反応室の内容物に印加されたときに前記隔室を所定の順序で相互に流体的に連結する手段とを具備しており、前記隔室は全てキュベットの外側の位置に対して流体に対して閉鎖されており、前記隔室の少なくとも一つはその中の検出地点において増幅の後の検出のため核酸材料を不動にするための手段を具備しており、増幅された核酸の検出を増幅された核酸材料による他のキュベットもしくは装置の汚染なしに行うことができることを特徴とする。この構成の効果は増幅した核酸材料の検出を、濃縮された核酸材

料によりコンテナもしくは装置の汚染なしに、実行することができるることである。

上記において、この発明の目的を達成するため前記反応室の試薬成分は核酸材料、ポリメラーゼ酵素、プライマー核酸およびニュークレオチドより成る。

この発明の目的を達成する、この発明の他の実現形態である、DNAを増幅および検出する装置において、(1) 複数の隔室と、これを少なくとも一つの他の隔室に相互に製造するための手段とを有するキュベットを有し、該キュベットは(a)DNAストランドを増幅するための少なくとも一つの反応室と、(b) 増幅されたDNAを検出し、検出地点を具備する少なくとも一つの検出室と、(c) 検出された材料を増幅されたDNAストランドに伝達する手段とを備え、(ii) 約30°Cから約90°Cの温度範囲を通して反応室の内容物の積極的若しくは受動的な循環を許容する手段を具備し、(iii) 増幅のためサンプルDNAを前記反応室に対する注入を許容するため、前記少なくとも一つの反応室に

のみ連結される液体アクセス手段を具備し、(iv) サンプルDNA の注入の後にDNA の通過に対して前記キュベットを遮断する手段を具備し、更に少くとも検出材料およびDNA ストランドを検出室において検出部位に移動する手段を具備する。一旦DNA サンプルが隔室に導入されアクセス開口が閉鎖されると、隔室内の流体内容物は運転者及び環境との接触が起こらないように増幅期間及び検出反応の期間は拘束される。

この発明の目的を達成する、更に別の実現形態である、環境を汚染するエーロゾルが外部に流出することを許容することなしに閉鎖キュベットにおいて核酸材料を増幅しかつ検出する方法は、(a) 核酸材料のサンプルをキュベットに注入し、該キュベットは、増幅試薬が存在する反応室と、検知材料と共に使用する収納室と、検知地点を含む少なくとも一つの室とを含む多数の隔室並びに流体の伝達を行わしめるため前記隔室を相互に連結する手段を具備し、(b) 核酸材料を包含する前記キュベットの部分を恒久的に遮断し、全ての核酸を

そのキュベットに封入し、(c) 前記試薬が有効となる所定の温度変化にわたってキュベットを循環させることにより核酸材料を増幅し、(d) 増幅された核酸材料を前記反応室から前記検知地点に流体的に搬送し、(e) 検知材料を前記検知点に流体提供に搬送し、並びに(f) 前記地点において増幅された核酸材料を前記検知材料と共に検出し、同時に核酸材料は前記キュベット中に封入維持することを特徴とする。

この発明を以下特に好ましい構造のキュベットを使用してDNA の増幅及び検出をするPCR 技術に使用する場合について説明する。しかしながら、核酸の増幅のどのような方法に応用したとしても有効であり、いかなるキュベットであっても、どのようなソースからであっても、増幅した核酸材料がいかなる構造かを問わずキュベットから逃げるのを防止する装置若しくは方法である限りは、どのようなソースからも核酸材料の増幅を行うことができる。核酸材料は、例えば、プラスミド若しくはクローン化されたDNA 若しくはRNA、又は

天然のDNA 若しくはいかなるソースからであるとをわずDNA から得ることができ、そのようなソースとしてはバクテリア、イースト、ビールス、ビールスやバクテリアに侵された細胞、植物若しくは動物である。DNA 若しくはRNA は血液若しくは組織の材料から抽出することができる。転写に基づく増幅と称され、PCR 法は異なった方法もこの発明の封入キュベットの利益を享受することができ、この転写に基づく増幅方法は1989年1月の米国のProc. Natl. Acad. Sci. 誌1173-1177頁(Biochemistry)に記載されてある。

PCR技術

核酸増幅技術は一般的にいえば特定のプロトコルを介して進められている。最も有益なプロトコルは米国特許第4,683,195号に示されるものである。手短にいうと、このプロトコルはDNA の増幅を次のステップから行うものである。

- (1) 関心のある配列を持つ少なくとも一つの特定の核酸を含有する候補となるサンプルを得る。
- (2) サンプルを変性させ、ストランドを分離

する。

(3) サンプルをプライマー、ポリメラーゼ等の延長酵素、核酸の複製に有益な増幅成分と接触させる。

(4) 上記2及び3のステップを必要な回数だけ繰り返す。

(5) 増幅されたDNA を検出する。

このクラスにおける好ましいプロトコルは次のようにになっている。

(1) 適当な制限酵素を使用することにより完全なDNA 二重らせんを必要に応じてで化学的に切断し、関心のある部分を分離する。

(2) 分離された核酸の部分(ここではDNA)及びニューケレオチドは加熱を受け、かつある時間(約10分より長くない時間)これを維持され、二つの核酸のストランドを変性させ、即ちこれらストランドをほどき、分離し、テンプレートを形成する。

(3) それから溶液が30° C-60° C の範囲で冷却され、プライマーをアニールし、もしくは二つ

の各テンプレートストランドを結合する。このため溶液は“培養”領域において適当な温度、例えば55°C、に約15秒の間保持される。

(4) 次いで、溶液は加熱され70°Cに維持され、延長 酵素(好ましくは熱に安定なポリメラーゼ酵素)は、そこに存在するデオキシリボニュークレオチドを使用することで、プライマーの境界をテンプレートストランドまで延長せしめる。

(5) 完成した新規なストランド対は再び92°C-95°Cに約10-15秒にわたって加熱を受けこの対は分離せしめられる。

(6) ステップ(3)-(5)が適当な数のストランドが得られるまで何回も繰り返えされる。繰り返しが多いほど生成される核酸(ここではDNA)の増幅数が多くなる。好ましい設定により、所望の濃度の核酸濃度を最小時間で達成することができ、各サイクルが1秒で起る。しかしながら、1サイクルを5分のように長い時間で行うことができる。

ここで使用されるプライマーという用語は天然にあるものであると、合成されたものであるとを

問わず、オリゴニューカレオチドのことであり、核酸ストランドに相補的なプライマー延長生成物の合成が惹起される条件におかれたとき合成を開始する開始点として挙動することができるものである。そのような条件はニューカレオチド(例えば4つの標準のデオキシリボニューカレオチドトリフオスフェート)及びDNAポリメラーゼのような重合試薬の存在と、適当な温度並びにpHが必要である。一般的にいって、この発明において使用される各プライマーは15から40のニューカレオチドを具備しており、そして好ましくは20から25のニューカレオチドを具備している。

以上の全ては、キュベット(cuvette)内で、約30°Cと95°Cとの間の温度の時間を使用して行われた。この発明のキュベットはPCR技術を技能者によってその技能が低くても正確に日常的に行わしめる実質的なアプローチを提供することにある。この発明の完全な理解のため、この発明で実施されたPCR技術の詳細をまず説明する。

どのようなDNAであっても数億回もの複製が実

行される。適当なプライマー核酸ストランドを設定することにより、最適条件の下で、選定されたDNAが第1に複製されることを確保することができる。好ましくは、全てのプライマーはキュベットに組み込まれるときビオチン化され、以下述べるように進行するのが検出される。今はプライマーに付着される目標のDNAを延長酵素の存在の下で加熱することにより選定されたDNAの複製を具備する二重ストランドが生成される。かくして形成された新規な対は次に高温度の短時間の変性を行うことにより分離される。これらは、一つの反応室で行われるが、その際、プライマー、デオキシリボニューカレオチド及び延長酵素がDNAに印加される予め組み込まれる試薬としてか、又はサンプルの印加時に存在していることが必要である。組み込まれているとき、試薬は噴霧もしくは乾燥によって印加することができ、ポリメラーゼ、塩基、バッファ、安定剤、及び複製に必要なニューカレオチドが含められる。

ポリメラーゼ酵素はそのソースに拘わらず有益

である。好ましくは、以後TAQと称するサモスアクアテックス(*thermus acuaticus*)から天然に製造されるもの、もしくはEPO公報第258,017号に例えば記載されるように、遺伝学を下に工業的に作られるどのような合成的な等価物とすることができます。

酵素の存在は熱循環を急速に行わせ、高温度での滞在時間が短縮される必要があることに注意されたい。92°Cから95°Cの変性温度は酵素の反応を停止する温度に近く、長い加熱時間となる。

その後、複製されたDNAが特定されるが、これはDNAを、適当な検出印加若しくは包含された検出室に移動することによって行われる。公知技術では、複製されたDNAのそのような“移動”ないしは検出プローブとしての試薬の添加によりDNAを含む反応室の再開放が必要となり、上述のエアゾルの問題を発生せしめる。この検出方式では複製されたDNAストランドにニューカレオチドの相補的な配列を介して接合することができる通常の材料を使用している。そのような材料は検出点、

例えば検出室、でDNAをトラップしつつ保持するのに使用される適当な手段を包含する。好ましくはそのような手段はトラップされる膜ないしはビードの構造をもっている。

検出においては一般的にいって固定材料および信号発生材料が必要である。好ましくはDNAの複製に使用されるプライマーはビオチン化が既にされており、不動材料もしくは信号発生材料のどちらかに付着されるアビディンと反応することができる。もしアビディンがビードのような不動材料に付着されると（以後アビディン-ビード捕捉方法）検知プローブが複製されたプライマーとハイブリッダーズするニューケレオチド配列とともに使用することができ、この複製プライマーは放射性となることなどによって自ら信号を発生しもしくは信号を発生する試薬と反応する。例えば、いかなるものでもよいが適当な信号発生成分に検出プローブは取り付けることができ、そのような信号発生成分としては、検知可能な信号（例えば色変化）を生成する無色(*leuko*)染料と反応するこ

とができる西洋ワサビパーオキシダーゼ(horse-radish peroxidase)等の酵素が好ましい。信号発生成分もしくは固定材料を3'もしくは5'末端でプローブに付着させる技術は公知である。例えば、Nucleic Research誌、vol 15、5303頁(1987年)の"Efficient Methods for attachment of Thiol Probe to the 3' End of Synthetic Oligodeoxyribonucleotides"という文献である。この文献で述べられている5'末端結合は枝葉であり、つぎのもの、Analytical Biochemistry のvol. 164、第336頁(1987)の"Introduction of 5' Terminal Functional Groups....."だけが重要なものである。容易に明らかなことは3'もしくは5'端部のいずれもが不動材料の信号発生成分に付着するのに使用できることである。

ここに使用する"プローブ"という用語は、プライマーのようにには挙動しないが、ハイブリッダーズ製造物を形成するように一つ若しくはそれ以上の核酸の配列と実質的に相補的となるように意図された、天然にある若しくは合成されたオリゴ

ノニューケレオチドのことをいう。さらに、プローブとは得られたハイブリット製造物の"捕捉"もしくは"検出"のいずれをも一般的には意図している。

これとは別に、検出プローブおよび不動プローブは同一のものとすることができる、前述のAnalytical Biochemistryの開示技術を使用して、例えば5'末端だけに結合することができる。

上述のように、アビディンは、西洋ワサビパーオキシダーゼ等の、以後"オリゴキャプチャー(oligo capture)"方法と称する信号発生材料に結合される。このような場合、DNAの固定化は好ましくは固定プローブにより行われ、ここに固定プローブは、複製されたビオチン化プライマーとハイブリッダーズするニューケレオチド配列である固定プローブにより達成するのが好ましく、そのような配列はポリマービードに結合される。

かくして、ここに述べた"検出材料"とは複製された、ビオチン化プライマー上のプローブを意味し、このプローブは検出可能な信号をそれ自体

で発生するか、検知可能な信号を生成するため試薬と反応するものである。この後者の場合は検出材料はそのような試薬も含有する。

全の検出材料を含有したキュベットは増幅をされたDNAと共に攪拌され若しくは振動され、混合を促進する。目標DNAへのプローブのアニーリングは通常の温度循環により達成される。

DNAへのプローブのハイブリッダーズは、トランサーに先立ちもしくはその後に検出地点（もしこれが設けられていればの話であるが）に対して行われる。

その後全の液体は検出地点から取り出される。この点において検出材料のある程度は複製されたDNAストランドの一部であり、DNAは膜の表面によって補足される。どんなDNAストランドでもこれを固定する手段を欠如したものは膜を越えて通過してしまう。

最終ステップは検出隔室に対して膜上に捕捉されたDNAストランドから突出する検知材料と反応することができる無色染料もしくは他の染料前駆

体を含有する検出隔室に注入する。有益な無色染料としては、ポリ(ビニールピロリドン)等の可溶性のポリマーと好ましくは組み合せされる、米国特許第4,089,747号に説明されるものがある。染料の好ましい例は2-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメトキシフェニール)-4,5-ビス(4-メトキシフェニール)イミダゾールであり、というのはこれは西洋ワサビバーオキスターの1分子に対して1000個の染料分子を付加することができるからである。

上に述べたようにDNAはビード上においてプローブ結合もしくはハイブリッダ化することができる。ビードは検出膜によって捕捉されるべく選定される。そのようなビードの有益な材料としてはDNAにハイブリッダ化するアビディンもしくはプローブのどちらかに結合される有効な反応グループを持つどのようなポリマーをも含むことができる。そのようなポリマー上の活性なハロゲン原子、2-置換活性エチルスルフォニールもしくはビニルスルフォニール介したアビディンの通常の共有結合が公知である。かくして^m及びp-(2-ク

ロロエチルスルフォニールメチル)スチレンのコ-ポリマー等がビードのために有効である。

上記の工程を実際的とするこの発明の二つの鍵となる点がある。その第1は有効な熱伝達を使用し、反応室の内容物が迅速に加熱され、それから迅速に冷却されるようになることである。積極的もしくは受動的な加熱もしくは冷却を行わしめる手段は、積極的もしくは受動的な循環を行う場合には有効である。即ち、ペルチエ(Peltier)の装置を、該室を区切る熱伝達壁を提供するように反応室に取り付けることができる。しかしながら、好ましくは、熱伝達は受動的な手段により達成することができ、この場合は、熱伝達材料は反応室の主要平面である。次いで、熱ソースもしくはシンク最も好ましくはキュベットの両面にある外部ソースから供給される。

第2の鍵となる点はキュベットの隔室を増幅された核酸が逃れるのを防止するように構成することである。即ち、隔室は増幅の発生後は環境に対して漏洩しないようにシールする必要がある。好

ましい構成は、隔室にDNAの導入の前に全の試薬を予め組み込み、かつ固定手段によりDNAの導入の後の漏洩に対するキュベットのロックをする。この実施例では、好ましくは印加圧力を使用して閉鎖されたキュベット内における隔室間で液体連通せしめ、必要な反応を得るために手段が設けられる。

熱循環

第1に好ましい熱伝達機構、即ち隔室の壁面による受動的な熱伝達、を考慮すると、壁の材料は高い熱エネルギー伝達係数を提供する所定の熱路長及び熱抵抗が得られるように選定される。最も好ましくは、そのような進路は約0.3mmより大きくはなく1平方cmの断面積での熱抵抗はワット当たり約5.0°Cより大きくなり。これらの性質は熱伝達壁をプラスチック、もしくはプラスチックおよび厚みが0.05mmのアルミニニューム等の金属のラミネートにより構成することにより容易に達成される。そのようなアルミニニュームは厚み χ /(熱伝導率K×表面積A)として計算される、約0.003

°C/wattとして計算される熱抵抗Rを具備している。(これらの値は、約0.24°C/ワットの熱抵抗を持つ同一の厚みの通常のグラスと対比することができる。プラスチックは好ましくは熱シール可能なポリエステル、例えばポリ(エチレンテレフタレート)、であり、その片側もしくは両側に中間の密度のポリエチレンが被覆してあり、好ましい厚みである0.005cmで1.06°Cの熱抵抗を持っている。

熱伝達壁は適当などのような手段によっても他のキュベット平面に固定することができる。そのような手段の一つは初期接着剤(priming adhesive)であり、これは例えば通常の高温度のアクリル系接着剤に通常のポリエステル接着剤の層が継続したものである。これらの層は熱伝達変速機の表面領域にわたって延びており、そのような延長部はアルミニニュームを使用している場合はキュベットの内部で起る反応と干渉することを防止することができる。これとは別にプラスチック層をアルミニニューム上に被覆することができる。

そのような熱搬送壁により構成されたキュベットは約200 μ l の液体容積のために、約10秒より長くない熱時定数 (τ) を得ることができると分かった。最も好ましくは τ が3-8 秒の程度である。即ち、水で充たされたこのキュベットが熱伝達壁の外部に沿って加熱されるとき、かつその温度がその熱伝達壁の他側の反応隔室の内部の点で計測されたとすると、熱反応曲線を28°C から103.9 °C の最終的温度まで発生させることができる。その中の液体が76°C の温度(差(103.9-28)の63 %)に達するのに要する時間は τ の値である。これは良く知られた次の熱反応式(1)からほぼ得ることができる。

$$\text{温度 } T(t) = \text{最終温度} + (\text{初期温度} - \text{最終温度}) \times e^{-t/\tau} \quad (1)$$

かくして、その時間間隔 t が τ に等しければ、

$e^{-t/\tau} \approx 0.37$ となる。そのような場合、 $t = \tau$ での $T(t)$ は初期温度の合計に (最終温度 - 初期温度) の63% をプラスしたものに等しい温度になる。そのような値からキュベットにおける液体のための τ は3.5 秒でなければならないことが判明した。反応

室内のアルミニウムと液体の間の中間層を使用した好ましい配置の場合、時定数 τ はキュベット内の液体が水のときは10秒より依然として大きくならない。

これとは別に熱源はデフォーカス(defocus)されたレーザとすることができます。熱伝達壁としての透明なポリエステルを使用することはそのような場合に好ましく、染料はレーザにとって適当な吸収波長を具備する反応隔室に組み込まれる。

封入

この発明の他の特徴に目を向けると、増幅されたDNA はキュベット中に拘束しなければならないことである。この実現のために増幅に必要な試薬(即ち、プライマーストランドであるデオキシリボニューキレオチドおよび延長酵素)は核酸材料のサンプルの添加に先立ってもしくは核酸材料がサンプルと一緒に添加されるに先立ってキュベットに予め組み込まれている。最も好ましくは検出材料はサンプルの添加に先立って組み込まれ、サンプルの添加後で増幅の前にキュベットは漏洩

に対して遮断され、それ以上のアクセスの必要がない。しかしながら、この代わりに、キュベットに検出材料が以下の条件の下に増幅のあとに収納室に印加されるのを許容するように構成してもよく、ここにその条件とは(1) 検出材料が印加される収納室は増幅に使用される反応室から分離しなければならず、(2) 収納室が試薬を増幅核酸に供給するのを許容し、しかし増幅された核酸が収納室に供給するのは禁止する一路チェック弁のような手段を設ける必要がある。

この発明の別の特徴によれば、キュベットは収納室と検知室との連通を提供するための手段を具備している。一つの実施例では、そのような連通手段は試薬を収納室から検出地点、例えば分離した検出室に移動させるための手段を具備する。そして最も好ましくは、この代わりに、加圧手段をキュベットの外部に設け、キュベットの壁面は外部から内部に圧力を伝達するのに充分な可撓性を具備しており、キュベットの内部で試薬の加圧および移動が可能である。どのような外部圧力源で

も使用可能であり、外部圧力源は、例えば、圧力ローラ若し空気シリンダからのピストンである。

例示的なキュベットの実施例

この発明のキュベット10の特徴はフレキシブルな隔壁(第1図) であり、この隔壁は外部の加圧手段(例えば、ローラ) と協働して、この発明の装置全体を構成する。もっと特定すると、キュベット10は二枚の薄いシート12, 14を具備し、このシートはモールディングにより作られ、ポケットもしくは隔壁と共に係合しあつ接觸するシート(第2図) の平面から突出する通路を接続するようになっている。シートは少なくともその外周16において、好ましくは隔壁もしくは通路を包囲する全の点で、熱もしくは超音波圧着により合着されている。熱応動型の接着剤、例えば、エチレンビニールアセテートがそのような接合に適している。液体注入孔22のところはシール16が破れており例外となっており、この孔22にピペット24が嵌合使用される。孔22はそこに延びる剛直な縁23(第4図) を持っており、その内部

にピベット 24 が着座する。

隔壁室は次のように構成される。隔壁 26 は反応室であり、必要に応じて、液状もしくは乾燥状の予め組み込まれる増幅試薬 28 を具備している

(第2図)。隔壁 30(第1図) 予め組み込まれた試薬としての洗浄水を具備した第1の洗浄室としての収納室を具備する。隔壁 32 は収納室であり、予め組み込まれた検出材料の少なくとも一つ、即ち増幅されたDNA、に結合される相補的なニューケレオチドを末端に有するビオチン化プローブを包含するとともに、信号発生成分、例えば前記した西洋ワサビパーオキサイドに結合されるアビディン等を包含しているのが好ましい。収納室 32 は第2の洗浄水含有収納室であり、収納室 32 の容積よりもっと大きい容積を具備しているのが好ましい。収納室 36 は残りの検出剤、例えばパーオキサイドと、ルーコ染料、例えば2-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメトキシフェニール)-4,5-ビス(4-メトキシフェニール)イミダゾールを、好ましくは安定剤としてのポリビニールピロリドンとの組

室 36 を、通路 54 は隔壁 38 を、夫々検出室 40 に接続し、各通路は第2図のような一時的なシール 56 を具備するのが好ましく、この一時的なシールはローラ 60 がシールを破るまで夫々の隔壁からの流出を阻止する。通路 54 は他の通路(48, 49, 50及び52)が接合される本線となる。

隔壁の位置は第1図において慎重に決定する必要があり、ローラ 60 が矢印 62 の進路 A に沿って前進するに従って各隔壁は適当な順序で隔壁 40 に向かって排出される。即ち、第1に増幅されたDNA が隔壁 40 に圧送され、次に第1の洗浄液が、次に隔壁 32 からの検出プローブが、それから第2の洗浄液が、次いで無色染料溶液が、最後に停止溶液が圧送される。ある場合には無色染料溶液からの染料の発生は暗所で行われ、これは例えば染料が光によって退色する場合である。夫々の通路は好ましくはローラにより圧搾されるように構成され、即ち、進路 A において矢印 62 に対していつも直角より小さい角度をなすように構成する。もしローラに対する角度が直角を形成するとする

み合せの形で具備している。収納室 38 は予め内部に停止溶液を含有しており、これは過多の無色染料が染料、例えばナトリウムアジドに変化されるのを防止するためである。

隔壁 40 はこの実施例の前記した検知点(サイト)であり、隔壁 42 は廃棄室であり、好ましくは初期は収縮しており、液体がその内部に圧送されるに従って膨脹するようになっている。隔壁 42 は隔壁 40 と通路 44 を介して連通する。必要に応じてあるが、一路チェック弁(図示しない)を通路 44 に設けることができ、これは洗浄液が隔壁 40 に逆流することにより不所望の背景色が付くことを防止している。

相互連結は以下の通りである。通路 21 は注入開口 22 を隔壁 26 と接続し、通路 44 は反応室 26 を検知室 40 と接続し、但し、46 の箇所に一時的なシールが設けられ、圧力がローラ 60 により発生されるまで、隔壁 26 内に導入DNA を維持する。通路 48 は隔壁 30 を、通路 49 は隔壁 32 を、通路 50 は隔壁 34 を、通路 52 は隔

と、ローラは通路を圧搾することがなくその代わり通路の上を飛び越ていまうことになる。

シート 12 および 14 の双方がローラ 60 により圧潰可能であるということは本質的ではなく、その少なくとも一方が 170g/cm の圧力の下で圧潰可能であるだけでも良い。1500g/cm のように高い圧力も使用可能である。第5図において、シート 12 は圧潰可能な比較的フレキシブルなシート、例えば、熱シール可能なポリエステル(例えば3M社により製造されたScotchpak™という商標の熱シール式の第229号フィルムにて作られ、一方シート 14 はその可撓性はより小さくかつ圧潰性も少なく、又はシート 12 と同一程度のフレキシビリティを持たせることができる。

少なくとも隔壁 26 についてはシート 14 は外側にアルミニューム箔のラミネート 64 (第5図)を有し、内側にポリマー層 66、好ましくはシート 12 のようなポリエステル層を具備している。アルミニューム箔は好ましくは約 0.0013cm と約 0.026cm の間の厚みを持ち、最も好ましくは厚み

は約0.005cmである。層66は約0.0013cmと約0.03cmの間の厚みを持ち、最も好ましくは0.005cmである。層66が存在している場合は隔室26の熱進路長は約0.3mmより大きいことはなく、熱抵抗は約5.0°C/wattを越えることがない。プラスチックの単一のシートというラミネート構造の利点は、隔室が一旦ローラによって圧潰されると、アルミニュームは再度の膨脹の抵抗になることがある。そのような膨脹が起るとすると下流の圧力で液体の逆流が起る。この理由で、シート14はキュベット10の全長にわたってラミネートを構成するのが好ましい。

好ましくは、隔室から噴射された液体は、さらに下流にある他の隔室を排除するのに使用される通路に逆流しないようになっている。この目的を達成するために、ローラ60が第1図の左側から右側に前進するとき、キュベット10に向け下降する挟み手段が使用され、以下のように通路を挟着する。

ローラ60が隔室26を横切ったとき挟着は点

第6図において、ローラ60が最初に出合う隔室は収納隔室61であり、この隔室61は洗浄水を具備し、通路62を介して共通配管54Aに洗浄水が排出される。残りの通路44A, 48A, 49A, 50A及び52Aは前記と同様に夫々の隔室から接続される。注入通路21Aおよび開口22Aは隔室61のためにキュベット10Aの対抗側に配置される。隔室61および通路62の機能はローラがこの隔室を圧潰したとき洗浄水で全の隔室の通路を溢れさせることである。したがって、一連の各隔室がローラにより圧潰されたときに、隔室26A内の増幅されたDNAが通路48A, 49A, 50Aもしくは52Aのいづれにも押し込まれる恐れはない。それは水がすでにそこに存在しているからである。そのような水は各隔室の内容物を検出室に伝達することに悪影響はない。

隔室61はその付加的な利益として隔室32, 36および38内に収納された乾燥試薬の再構成を可能とすることがある。即ち、各隔室の夫々の通路への出口を閉鎖する軽熱シールが省略され、これら

P₁において実行される。隔室30を横切って移動する際にピンチングは点P₂の箇所で実行され、同様に隔室32についてはピンチングはP₃の隔室で実行され、隔室34についてはP₄で、隔室36についてはピンチングはP₅において実行される。

以上の代わりに予備洗浄室を第6図のように設けることができ、この室は全ての出口通路が第1に水で充填されることを確保し、その結果、上流の隔室が下流の隔室のための通路に対して逆流しなくなる。以前に説明されたと同一の部品は同一の番号を使用するが区別するためサフィックスAが付加される。

(以下余白)

の試薬がその隔室で乾燥され、それから隔室61がローラ61によった加圧され、キュベットに水を溢れさせた場合に、隔室61の水は乾燥試薬を再構成する。その補助のためキュベットを必要に応じて振ることができる。この再構成ステップはサンプルを反応室に注入の前、後もしくは反応室内での増幅の前、後に起る。

上述の実施例は各隔室を逐次的に加圧することが特徴である。しかしながら、挟みポイントP₁～P₅を使用した場合は全ての液体含有隔室を同時に加圧することができる。即ち、通路44を除いて出口通路を閉鎖するためP₁～P₅の全に圧力が印加した場合に圧力が全ての隔室26, 30, 32, 36及び38に同時的に（例えば適当に配置された空気ピストンによって）加わる。しかしながら、通路44だけが閉塞されているため、増幅されたDNAのみが伝達されることになる。次にポイントP₁のみが開放され、洗浄流体が通路49を介して送られ、このようにして挟みポイントP₅が最終的に解放されるに至る。注意すべきは印加圧力は液体を夫々

の隔壁及び通路に閉じ込める縫い目の破裂に要する圧力より小さいことである。検出隔壁40(第1,3図)は検出部材39を具備する流通型隔壁であり、この検出部材39は支持シート41であり、同シート41上にバイル43,43',43''および43'''が配置される。もしオリゴキャップチャーフ法が使用される場合は各バイルはポリマービードより成り、そのビード上に上記したようなプローブが不動に結合され、検出すべきDNAとハイブリッダ化される。最も好ましくは各ビードは異なったDNAのための異なった検知プローブであり、もし充分な異なったビードのバイル(例えば8から10)が存在するとすれば、どのビードが隔壁からの染料からの色を変化せしめたかということに基づいた組織判別を実行することができる。そのためのラテスピードは普通である。

シート41はビードのバイルに接合する材料から選定され、製造の間にデボジットされかつ乾燥されるとき所定位置に保持される。有益な例としてはPall社により製造されるニトロセルロース、

いて本質的に平坦に重ねられる。それからこの二つのシートは、通路21と隔壁26との接合点を除き第1図の斜線をもって示す各隔壁の外周で軽く合体される。例えば、軽微な熱シールにより、各隔壁の夫々の流出通路に対する出口を含めたこれらの部分で二つのプラスチックシートを合体することができる。これは導入時に隔壁から流出する液体に対する一時的なブロックとなり、このブロックはローラ60が印加されるときは破られる。(このような一時的なブロックは第2図の通路48,49,52及び54の断面において破線として現れており、液体が隔壁から圧送され、この一時的なシートに導かれたとき分離する箇所を表している。)

その後に、強固なシール(熱シール)が各隔壁およびその流出通路の周囲において加えられ、しかしながら隔壁に対する通路の接合部を横断するようにはシールは行われないように配慮されている。外周にも熱シールがされる。隔壁の周囲のシールは、隔壁から押し出された液体が夫々の通路に沿ってのみ流れ、シート12と14との間の他

多孔性ナイロン膜であり、最も好ましくはラテスピードコーティングした紙である。そのようなラテスピードコーティング紙は次のようなものである。即ち、中間値で紙の重量は約54g/cm²で約6.0mmの厚みであり、約80%の硬材にて作られ、紙の表面に糊付けされ、次いで平均約7g/cm²でラテスピードがコーティングされ、コーティングはその成分として通常の工業用グレードのラテスピード、20重量%のNaOH、分散剤としてのTSPP、シリコンディオキサイドおよびチタニウムディオキサイド等の不透明材、水溶性粘度(hydrasperse clay)および残りの希釈水を具備する。

シート12及び14は次のように準備され組立られる。シート14は第1図、第2図に示すように形成された隔壁凹部を予め成型している。シート14を上下さかさとし、カップを形成する凹部とともに、試薬が印加され、ここに試薬とは乾燥試薬28及び隔壁30,32,34,36及び38への液体等である。次に、この時点では上側シートであるシート12が第2図の26'で示す係合凹みの箇所を除

の部分には流れないことを補償するものである。

キュベット10を使用する場合は患者サンプル5は孔22のピペット24を介して第5図の隔壁26に注入される。これは凹んだ部分26'が飛び出し、第2図の破線、第5図の実線で示すシート12の残りの部分と面一となるに至る。

その代わりに部分26'はシート12の休止平面を越えて飛び出し、第19図に示す対向膨脹部26"を形成させることができる。さらに、第19図に示すようにシート12及び14は金属的な成分もしくは層を全く持たず、全体をプラスチックによって構成することができる。即ち、プラスチックだけでもプラスチック相当は充分な熱伝達速度を提供することができる。

本質的なことは第1図および第4図の開口22は、増幅ステップに先立ってピペット24が引き抜かれた後に閉鎖可能であることである。これは閉鎖された開口を熱シールする、開口を適当な方法(例えば強固なシール機能を持った熱シールストリップ12及び14による)、もしくは図示し

ない一路弁をもったリム23を構成することによって行うことができる。孔22を熱シールする場合はリム23はシールすることができ、ピペット24は単にこの孔に直接的に押し込むことができる。どのようなモードの閉鎖手段が採用されたとしてもPCR増幅もしくは液体搬送の間に形成されるどのような圧力にも有効に抵抗できるものでなければならない。熱シールは好ましい方法である。

上記のように、加熱および冷却により必要な熱PCR循環が好ましくは隔室26で一つもしくは双方のストリップ12および14を加熱することによって起る。

増幅されたDNAが隔室40に侵入するとき、DNAはそこに短い時間保持され、一方熱はストリップ14を介して印加され、ハイブリッダサイズが行われる。好ましくはストリップ14は隔室40で透明であり、適当な波長の放射(可視波長光)の伝達を許容し、内容物の試験が可能となる。隔室42は膨脹することにより液体流入流束及び空気流入流束を収容するよう膨脹することができる。

きに隔室26Bだけが液体、即ちサンプルDNAと増幅試薬とを具備する。(その注入開口22Bはこの時点では閉鎖される。)他の隔室は開いたままとすることができる。それは一時的な熱シールがその出口通路との接合点で形成されることによる。付加的な安全策として、チェック弁80が通路54Bに設けられ、DNAがこれらの隔室に逆流するのを防止することができる。そのようなバルブは通常のものであり、例えば、第8図に示すようにシート82と、ボール84とを具備し、このボールが上流に押し戻されると、シート82上に着座し、流れを止める。ボール82はフリーであるが小さなストッパ86に突き当たるまで動くことができる。

バルブ80は本線上に位置するのが好ましく、それはこれにより一つのバルブで全ての収納室をまかうことができるからであり、かつ進路Aから外れており、加圧ローラの進行に対する障害とならならないのである。

各収納隔室がその適当な液体をピペット(第6

予め使用の前に膨脹されているからである。その代わりに、キュベットを処理するのに使用される器具に真空プレートを具備せしめることができ、これは無駄容積が必要な場合にバキュームによつて隔室42を第3図に示すような膨張形状に成形する。

増幅の際およびその後に全の隔室30-38が霧囲気からシールされていることは(第7図、第8図)もし増幅されたDNAが逆流によって隔室に侵入することを防止できるように構成されている限りは本質的なことではない。以前に説明したのと同様な部品は同一の参照番号とし、区別のためのサフィックスBが追加されている。

即ち、キュベット10Bは全て前と同様に隔室26B, 30B, 32B, 34B, 38B, 40B及び42Bを具備し、その通路はこれらの隔室を相互に連結し、前と同様に機能する。しかしながら、各隔室はその周囲において液体注入開口70を具備し、連結通路72と共に霧囲気から夫々の隔室に対する流体通路を提供する。このような構成により、DNAの増幅のと

図)から受け取った後で、加圧ローラが進路Aを移動する前に、各開口70は開口22Aの場合と同様に密閉される。これとは別に開口70は予め組み込まれる全ての試薬を充填するのに使用することができる。

他の残りの実施例では、隔室の圧潰可能なフレキシブル壁の代替として、増幅されたDNA及び検出材料等を含む液体を移動させるため(もしくは全ての隔室を流体的に相互に手段は適当な隔室を形成するため)ピストン室内にピストンが設けられる。即ち、ピストンは隔室のフレキシブル壁の等価物である。

即ち、第9-12図において、キュベット100(第9図)は熱伝達壁114(第10図)を具備する反応隔室126と、検出材料収納室132(第9図)と、洗浄液収納隔室134と、無色染料収納室136と、停止液収納室138と、ほかの洗浄液収納室139と、夫々の隔室に導く通路144, 149, 150, 152, 154及び156とを具備する。平面114は前の実施例と同様に構成するのが好ましい。各隔室はピストン室として

機能し、各室には隔室内の試薬の外側に配置される夫々のピストン113 もしくは115 がある。好ましくは、ピストンは図示のように二重シール型でありその隔室用の駆動アクチュエータ（図示しない）と確実係合するスロット（図示しない）のごとき手段を具備している。そして、通路149 及び150 は第9 及び12図の隔室126 と通路151 を形成するように接続している。流入DNA サンプルは、外部肩部123 を具備する液体侵入開口122 から通路121 を介して隔室126 にも供給される。

通路152, 154 及び156 は第12図で示すように通路155 で合体接続され、この通路155 に通路144 は隔室126 からの供給を行う。通路155 はそれから隔室140 への通路157 肩部123 内の159 の点で流出する通気通路を構成するように分岐する。肩部123 は内部にねじ（図示しない）を切っており、外ねじを切ったトップを受け取ることができ、その結果双方の流入開口122 及び通気開口159 はトップによりシールされる。

膨脹のためのフレキシブルな平面は存在しない

膜194 はDNA にハイブリッダ化されたものからフリーな未反応の検出ラベルを分離するのを助けるものである。即ち、隔室132 内の検出プローブは、一旦液体が隔室140 に到達すれば隔室126 内の増幅されたDNA をハイブリッダ化すると共に膜194 に（もしくは膜にトラップされたビードに）係合される。そのようなプローブは西洋わさびバーオキシダーゼのようなラベルを具備しており、これらの材料が隔室140 に到達する無色染料と反応して過酸化物を形成する。隔室132, 134, 136 及び138 の充填は液体を印加し、それからピストンを挿入することにより達成される。その代わりに予めパッケージとしたアンプルが挿入され、次いでピストンが挿入される。アンプルは脆弱に作られているのでアンプルは破断し、液体は放出される。

キュベット内の液体の伝達は全てピストン113, 115 及び184 により制御され、ピストン184 は他のピストンが前進するのを許容するバキュームを発生するのに使用される。

ので、別のピストンチャンバ182 とピストン184 とが設けられ、検知隔室140(第9 、10及び12図)からの空気の膨脹を可能としている。チャンバ182 は通路185 を介して隔室140 の底部に接続される。これはそのチャンバ内の手動引き抜きピストン184 により行うことができる。ステム187 はピストン184 から突出しており、そのピストンを引き出すのが容易になる。

第9 図に着目すると、流通室140 は上部190 を具備し、流体が他の隔室に搬送されるときにこの上部に最初に流体が流入され、更に流通室140 は下部192(第10図) を具備し、この下部192 は通気性の膜194 によって上部から分離される。下部192 は吸収剤194 によって実質的に実質的されていて、隔室140 に流入する過剰液体は全て吸収することができる。膜194 は成型、製織、もしくは電気光学的切削による微粒透過膜であるのが好ましい。どのような適当な材料も吸収剤として使用可能であるが、例えばセルロースアセテートがある。

この代わりに、図示しないが、付加的な隔室およびそれに関連するピストンが具備され、付加的な酵素を隔室126 に供給し、変性ステップによる酵素のどのような非活性化に対してもより大量の酵素を追加することにより対応することができる。

キュベット100 は次のように使用される。最初にピストンは第9図の図示のように位置され、サンプルDNA はピベットを介して開口122 に導入される。通路121 を通過するときにサンプルは隔室126 に入り、隔室126 には増幅試薬がすでに存在しているかDNA と共に増幅試薬が導入される。通気開口159 及び通路155 は隔室126 内の空気が前進する液体により押し出されるのを許容する。以後、トップが肩部123 に挿入され、開口122 及び159 をシールする。熱循環が所望のDNA の増幅が達成されるまで熱伝達壁114 を介して行われる。このポイントまでピストンは動かない。

次に隔室132 のピストン113 が前進され、隔室132 の検出材料を隔室126 に押し出す。即ち、アビディン-ビード捕捉方法の場合は、隔室126 の

内容物は好みしくはポリマービードを具備し、ポリマービードにアビディンを介してビオチン化プライマーが係合されており、このビオチン化プライマーはアニーリングステップにおいて増幅されたDNAと共に延長することができ、これにより増幅されたDNAの複製を行う。隔壁はまた検出プローブを具備し、検出プローブはニュークレオチドであり、西洋わさびパーオキシダーゼのような試薬と結合してハイブリッダライズするように構成される。隔壁134からの洗浄液はピストン115により押圧され、必要であれば全ての検出試薬が隔壁126に存在することを補償する。それから混合が通常の手段によりキュベット全体を攪拌することにより行われる。検出プローブはそれから隔壁126内で通常のステップにしたがって熱制御を壁面114を介して42°Cで例えば5分間行うことにより増幅DNAにハイブリッダライズされる。

次に、付加的な洗浄溶液が隔壁134から押圧され、ハイブリッダライズされた液体を隔壁126から検出室に押し流す。またピストン115は隔壁139

から通路156および155を通して押し流すように前進され、通路155に依然残留しているハイブリッダライズされた流体を隔壁140に押し流し、通路144における残留されたハイブリッダライズ流体を次に来る無色染料から分離する。充分な洗浄液が隔壁126及び140を通され、全ての材料、トラップ手段に結合されなかったフリーな検出プローブ等が膜194を通して吸収剤196に通過される。この洗浄ステップにおいてはピストン184は引っ込む必要があり、これは背圧が隔壁126から隔壁140への液体の搬送に抵抗することを防止するものである。

次に、隔壁136の第1の無色染料が、次いで隔壁138のストッパ溶液が夫々のピストン113を前進させることにより通路155および157に、それから隔壁140に運ばれる。これは、適当なDNAがそこに存在しているとすれば、膜194で適当な染料を形成せしめる。(もし存在していない場合は、フリーな検出材料は全て既に吸収剤196に押し流されていることから、色は全く形成されることが

なく、試験は否定的な表示を行うことになる。)

検出箇所を構成するために別体の検出隔壁を特に設ける必要は本質的ではない。次の実施例に関して説明するように、検出サイトは反応室と同居することができる。前に説明したと同様の部品は同一の参考番号を付すものとし、区別のためサフィックスCを付けるものとする。

第13図において、キュベット100Cは隔壁126C、132C、134C、136C、138C及びこれらの隔壁への又は隔壁からの、さらには流入開口122Cからの通路を以前と同様に具備する。ピストン113C、115C、184Cは前と同様に同様の工程で得られるDNAの増幅の後の液体の搬送に使用される。しかしながら、隔壁132Cは検出試薬として磁性充填剤を含有するポリマーから形成される磁性ビードを具備しており、符号したDNA連鎖を持つハイブリッダライズ材料がこの磁性充填剤に結合される。これは、増幅されたDNAの一端等にハイブリッダライズさせるためのものである。増幅DNAの他端は前述のように西洋わさびパーオキシダーゼを担持した検出プローブ

にハイブリッダライズさせるためのものである。

この実施例では、DNAに未だハイブリッダライズされていないフリーな検出プローブをハイブリッダライズされたものから分離するため次のことが行われる。洗浄溶液が隔壁134Cから注入されたとき磁場が隔壁126Cの下側に印加され、ビード試薬および増幅DNAにハイブリッダライズされる検出プローブを保持する。これはフリーな検出プローブ及びそれらのラベルを隔壁126Cから隔壁182Cに押し流し、隔壁182Cではピストン184Cは収縮し、そのための室を形成する。磁場は維持され、無色染料およびストッパ液体が運びこまれ、反応室である隔壁126C内に増幅DNAが存在するのであれば色が生成される。

第8-12図のキュベットの代わりの他の実施例として、隔壁132、134、138、182もしくはそのCを付した対応部分が延長され、その結果これらの隔壁はキュベットにL字型を付与する第8図の平面(図示しない)から90°突出する。このような配置はモールドの構造及び製造を単塔にする利点が

ある。

この発明のキュベットにおいてセル内でDNAを抽出することができるキュベットの使用に先立った段階で抽出する代わりに可能である。このような場合はキュベットは第14図のように構成するのが好ましい。以前に説明したのと同様な部品は同一の番号を付するものとし、区別するためサフィックスDを付する。

キュベット100Dは前と同様の隔室126D, 132D, 134D, 138Dを具備しており、かつピストン113Dが収納室内において使用される。肩部123Dは液体流入開口122Dを保護し、検出は以前と全て同様であり膜(図示しない)のところで行われる。しかしながら、通路121Dはビベットにて注入されたサンプルを反応室である隔室126Dに搬送する代わりに、サンプルを抽出隔室200に搬送する。この場合の液体サンプルはそのままの血液もしくは血液細胞であり、これらのサンプルからDNAの抽出が行われる。液体サンプルがキュベットに印加される時点において、以下説明する抽出剤がオプション的

に印加することができる。この代わりに抽出剤を隔室200に予め組み込みすることができる。

他の類似の隔室と同様にピストン113Dが隔室200に使用され、但し、異なったところは、図示のように完全に引っ込むことができ、導入されるサンプルのために最大の空間を付与することができる。通路121Dはピストン113Dの直下のポイント201で隔室200に入る。

隔室200の対向端202で通路204は中間室206に流体的に接続され、この室206に隔室126Dへの液体が通過するフィルタ208が配置される。フィルタ208の孔寸法はフィルタ内の細胞の断片を保持するが抽出されたDNAは通過させるような寸法とする。例えば、フィルタを、約0.45ミクロンの孔寸法のナイロンもしくはポリプロピレンにて形成することが特に好ましい。

隔室206から通路210は抽出されたDNA及び溶媒(例えば水)を隔室126Dに運ぶ。

使用時に、液体サンプルは隔室200に好ましくは抽出剤と一緒に注入される。どのようなDNA抽

出プロトコルも表面活性材のような共有抽出剤と共に使用することができる。最も好ましいものは溶液を約5分に渡り95°Cの温度まで単純に加熱することである。そのような加熱は蛋白質を変性し、細胞を分離するのに有効である。この抽出方法の補助としてデキストランが必要に応じ3重量パーセント、10重量パーセントのTX-100溶液と共に印加され、ここにTX-100はRohm and Haas社から入手することができる非イオン性の表面活性剤である。隔室200の加熱は、アルミニュームから隔室の平面の少なくとも一部220を構成することによってより一層急速に行うことができる。このアルミニュームはキュベットの底部外側(別の表面としては図示していない)まで延びている。隔室200に近接してキュベットの底面に熱を印加することにより隔室200を有效地に加熱することができる。

適当な培養期間の経過の後に、隔室200の内容物はピストン113Dを前進することによりフィルタ208に押し込まれる。

ある場合には、検出室において積極的若しくは消極的な制御を選定されたDNAの検出サイトに沿って行なうことが好ましいことがある。第15, 16図はこのことを行う変形例を図示する。以前に説明したのと同様の部品は同一の参照番号を使用するものとし、区別するためサフィックスEを付す。

第15図において、以前と同様にキュベット100Eは隔室126E, 136E, 138E, 182Eを具備し、加えて、適当なピストン184E等を具備する。通路121Eは開口122Eから反応室126Eに液体サンプルに通び、通路151Eは液体をその隔室に運搬する。ビオチン化されたプライマーは適当な位置から運ばれ、無色染料及びストッパ溶液は検出サイトに導かれる通路157Eに通路157Eを介して搬送される。通路144Eは隔室126Eに生成されるDNA生成物にその通路155E, 157Eでアクセスせしめるためのものである。通路157Eから来る液体は吸収剤196E(第16図)に接触するように配置される検出膜194Eと出会い、これは前の実施例と同様である。

しかしながら、前の実施例と特に異なっている

のはサンプルDNA 検出のため膜194Eに別の領域 S があり、正の制御のため "+" の符号が負の制御のため "-" の符号が付されている。正の制御の目的は DNA が存在している場合に試薬がDNA の信号（好ましくは色）を発生することを補償し、即ち使用者に、 "+" 領域で信号を発生するのに失敗したということからいずれにしても試薬が欠陥があるということを知らしめることができる。負の制御の目的はサンプル色を比較すべき背景色を使用者に知らしめることである。即ち何らかの理由により試薬内において背景色の変化が起り、正の読み取りがその試験の結果であると決定する前にサンプル色は密度がこれより有意に大きくすることができますの点で重要である。

これを行うための幾つかの方法がある。第15, 16図の実施例では使用された実施例はアビディン-ビードキャプチャーである。この方法の特徴はビードに供給結合されたアビディンもしくはストレプトアビディン(streptavidin)、ビオチン化プライマー、検出材料の一部としてのラベルを付け

たプローブを使用することである。好ましくは、少なくともプローブは収納隔室250, 252, 254 に保持される。各隔室は単一タイプの検出プローブに割り当てられており、隔室250 はサンプルDNA プローブ、252 負の制御プローブ、254 正の制御プローブを具備する。ピストン260 は夫々の隔室を好ましくは同時に加圧するのに使用され、その内容物を、夫々の通路262, 264, 266 を介して、各プローブ及び各プローブ通路に関連する検知室268, 270, 272 に付勢するものである。かくして、各検出室は内部にそのプローブのみ有し、ほかの二つは全く持たない。

増幅されたDNA 及び他の試薬の全ての3つの検出隔室に対して供給を行うため、通路157Eは好ましくは3のプランチ274, 276, 278 に分離され、これらのプランチは検出隔室と接続される。

容易に理解することができようが3つのうちの二つのプローブは適当なDNA と相補的な遺伝学的材料を持つ。サンプルのためのプローブはサンプルの目標DNA の遺伝学的な相補物である。正のプローブは常に存在するDNA 材料のための遺伝学的相補物であり、少なくとも血液細胞の場合はベーターグロビンである。負のプローブはサンプルから未知の増幅DNA と合う遺伝学的相補物である。これを最も容易に行うのはプローブ相補物をその遺伝学的符号が連鎖においてランダムであり、無意味コードを構成することである。

以上のことから容易に理解することができようが、このプロセスは以下のように行われる。アビディン担持ビードは好ましくは隔室250, 252 及び254 に収納される。増幅されたDNA は通路274, 276, 278 を介して夫々の検出介してに供給され、ピストン260 は前進され、適当なプローブおよびビードを検出室に押し出す。これらの隔室は適当に加熱され、増幅されたDNA は特に隔室268 及び272 において隔室250 および254 から適当なプローブにハイブリッダーズされる。好ましくは、検出室270 にはハイブリッダーズが起らない。それは負の制御プローブと反応する無意味DNA が存在すべきでないからである。その後、洗浄溶液が検出

隔室を介して押圧され、膜194Eを通して未ハイブリッダーズのラベルされた即ちビードに結合しないプローブを吸収剤196Eに押し流す。この押し流しの後に無色染料液との接触ついでストップ溶液との接触が行われる。

もう一つの実施例は所謂オリゴキャプチャー技術を使用するものである。その場合第17, 18 図に示すようにラベルを付したプローブは増幅DNA の導入に先立ち検出膜上に不動の形態で収納されている。以前に説明したのと同様の部品は同一の参考番号を付与するものとし、区別のためサフィックスFが付けられる。

この実施例において使用されるオリゴキャプチャー方法はプローブが膜、もしくは膜上にもしくは内にトラップされたビード上に不動とされており、そのプローブは適当なDNA に相補的な遺伝学的材料を具備する。他の隔室(139F)では増幅されたDNA 上でビオチンと反応するためのラベルDNA は例えば西洋わさびバーオキシダーゼとすることができます。

第17および18図においてキュベット100Fは検出室190F及び収納室139F(第19図)に何が収納されているか以外は第9図の実施例と同一である。もっと特定すると、サンプルDNAプローブは膜194Fの部分Sで不動とされており、正の制御プローブは“+”の部分で不動にされており、負のプローブは“-”の部分で不動とされている。そのようなプローブを担持する膜の各部分194Fは好ましくは他の部分と接触しない。

この場合のプロセスでは増幅DNAは通路157Fを介して検出室190Fに導かれ、膜194Fの表面全体の上を流される。適当な加熱により増幅DNAは特定にハイブリダイズされ、かくしてS領域のプローブに結合し、そこに散在したDNAは“+”領域においてプローブに結合され、“-”領域では好ましくは全くハイブリッダイングしない。洗浄溶液は隔壁190Fに134F又は他の部分から付勢され、次いでアビディン-ラベルがビオチン化生成物と反応し、ハイブリッダイングされて増幅目標DNAもしくは正の制御DNAとなる。その後、洗浄溶液が印加され、

それから無色染料が印加される。

効果

この発明の技術的効果はこの発明のキュベットおよび方法により得られた増幅核酸はその得られた増幅核酸により環境を汚染するおそれがなく、それは核酸を入れたキュベットの領域を再度開ける必要がないことによる。

ほかの効果としてキュベットは比較的に未熟なものでも増幅作業をすることができる。

また、この発明のキュベットおよび方法は自動処理に対処することができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図はこの発明のキュベットの平面図。

第2図は第1図のII-II線に沿って表される断面図。

第3図は第1図のIII-III線に沿って表される断面図。

第4図は第1図のVI-VI線に沿って表される部分的断面図(但しビベットは省略)。

第5図は第1図のV-V線に沿って表される拡大

部分的断面図。

第6図は第1図と類似するが他の実施例を説明する部分的平面図。

第7図は第1図と類似するが他の実施例を示す平面図。

第8図は第7図のVIII-VIII線に沿う断面図。

第9図は第1図と類似するが、他の実施例を示す部分的断面平面図(第11図のIX-IX線に沿って表した断面図)。

第10図、第11図、第12図は第9図の夫々X-X線、XI-XI線、XII-XII線に沿って表される断面図。

第13図は第9図と類似するが他の実施例を示す部分的断面平面図。

第14図及び第15図は第9図と類似するが夫々他の実施例を示す一部断面で表した部分的平面図。

第16図は第15図のXVI-XVI線に沿って表す断面図。

第17図は第9図と類似するが他の実施例を示す一部を破断して示す部分的平面図。

第18図は第17図のXVIII-XVIIIに沿って表

される断面図。

第19図は第5図と類似するが他の実施例を説明する断面図。

10, 100, 100C, 100d, 100E …キュベット

26, 26A, 26B …反応室

30, 30A, 30B …収納室

32, 32A, 32B …収納室

34, 34A, 304B …収納室

36, 36A, 36B …収納室

38, 38A, 38B …収納室

40, 40A, 40B …検出室(検出サイトを具備)

60 …外部圧力源(可動手段)

113, 113C, 113D …ピストン移動手段

115, 115C, 115D …ピストン移動手段

126, 126A, 126B, 126C, 126D, 126E …反応室

132, 132A, 132B, 132C, 132D, 132E …収納室

134, 134A, 134B, 134C, 134D, 134E …収納室

136, 136A, 136B, 136C, 136D, 136E …収納室

138, 138A, 138B, 138C, 138D, 138E …収納室

139, 139A, 139B, 139C, 139D, 139E … 収納室

140 … 検出室、

184, 184C, 184E … ピストン移動手段

126C, 194E, 194F … 検出サイト

260 … ピストン移動手段

特許出願人

イーストマン コダック

カンパニー

特許出願代理人

弁理士 青木 朗

弁理士 石田 敏

弁理士 三井 孝夫

弁理士 山口 昭之

弁理士 西山 雅也

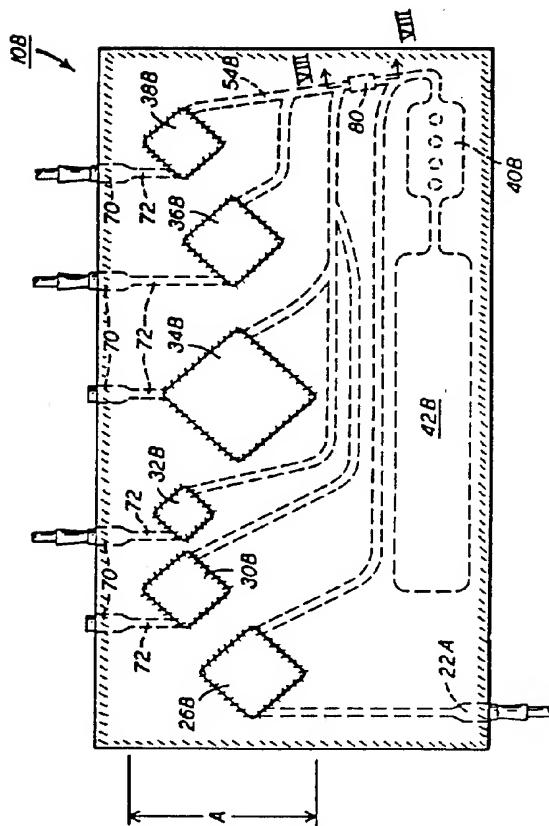


FIG. 7

FIG. 1

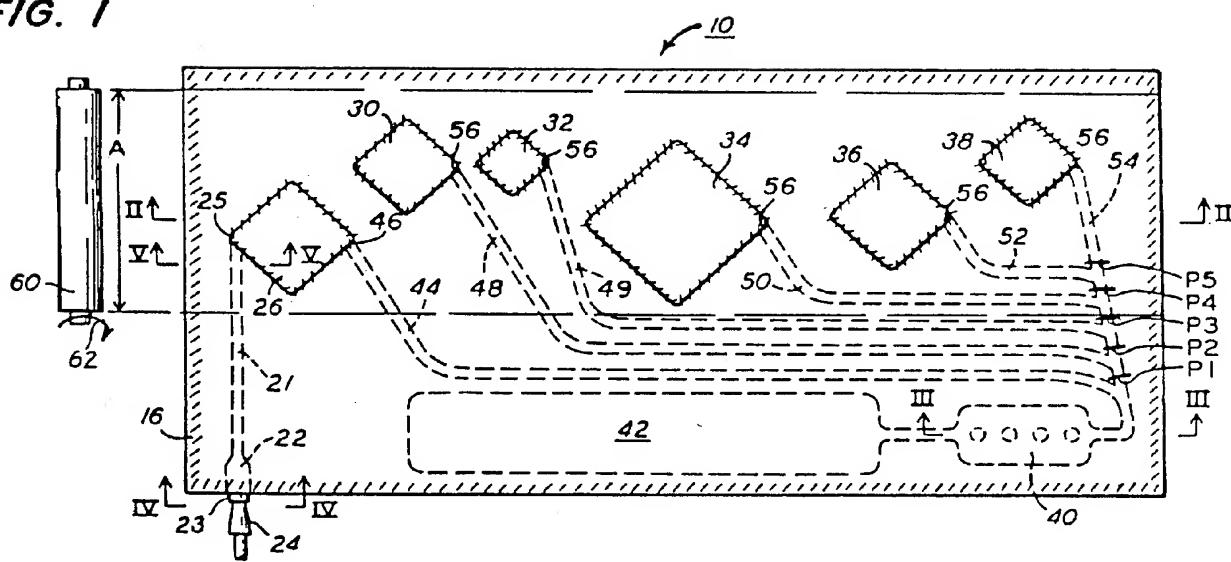
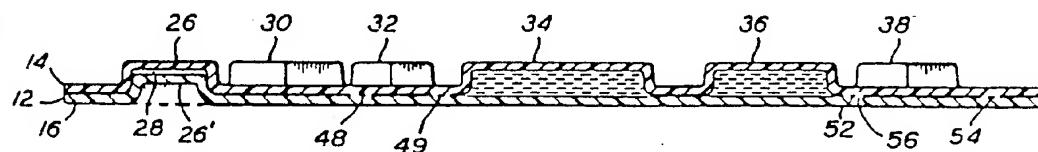


FIG. 2



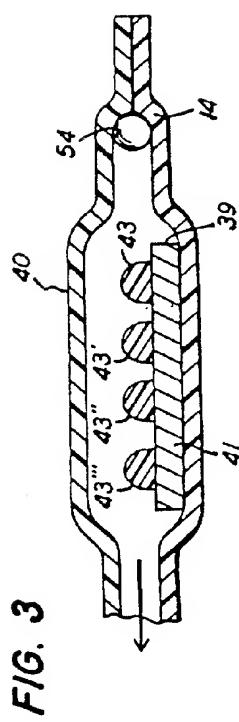


FIG. 3

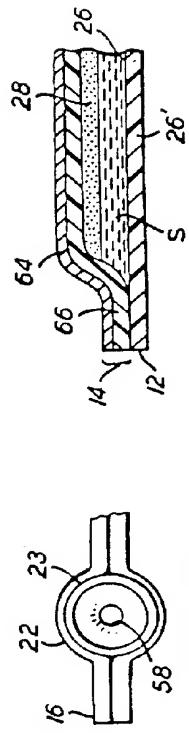


FIG. 4

FIG. 5

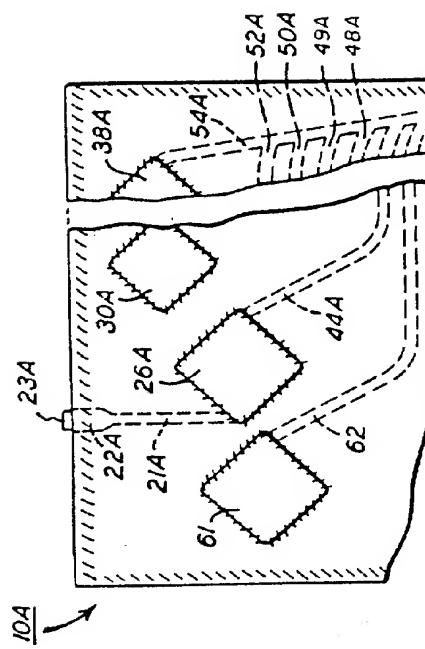


FIG. 6

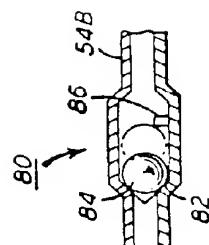
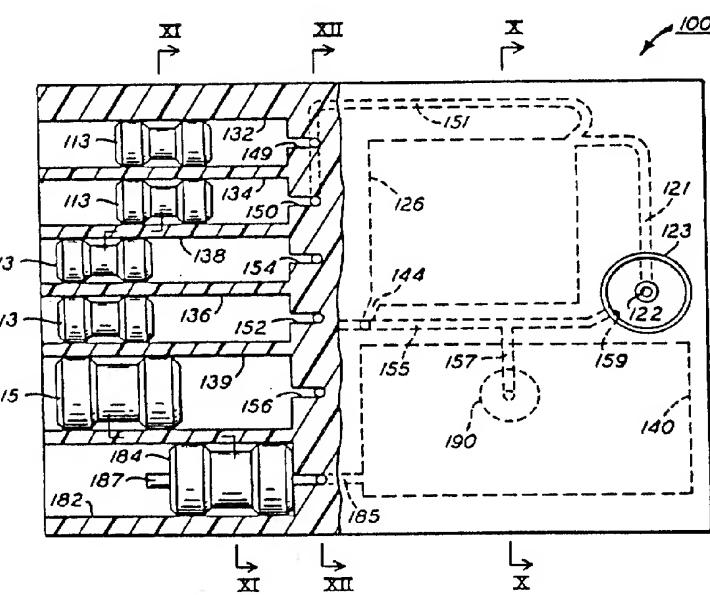
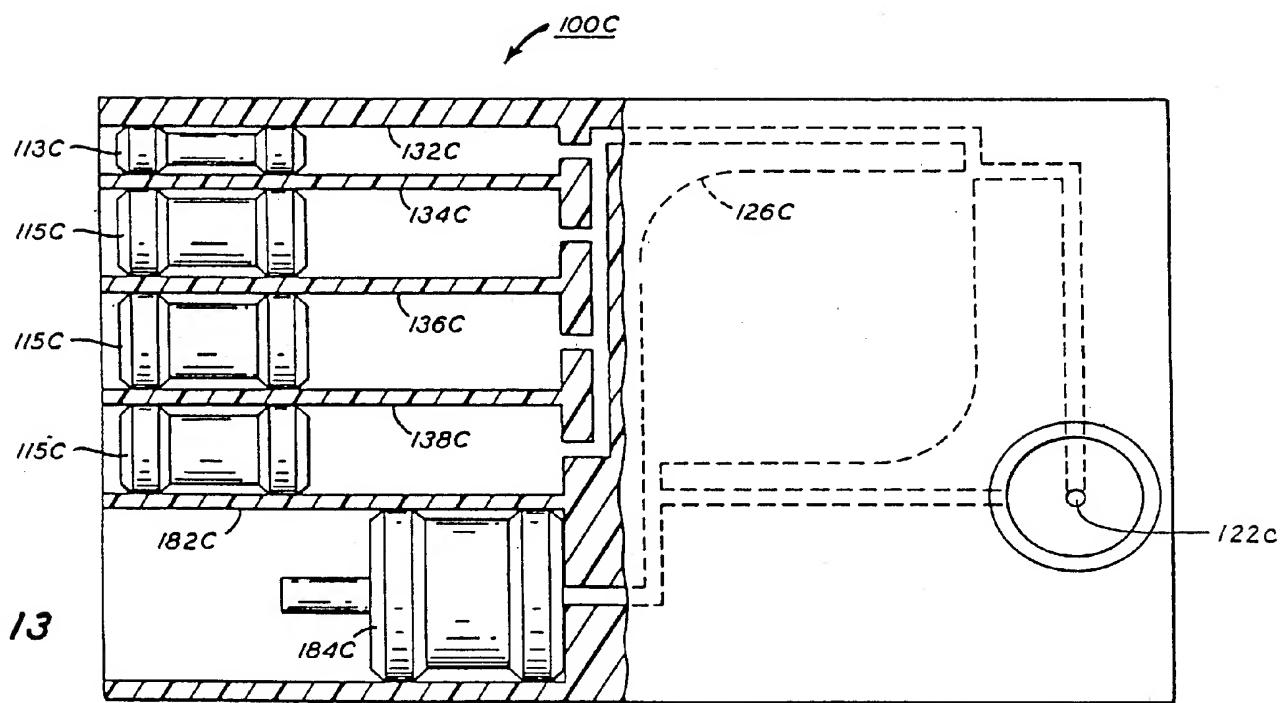
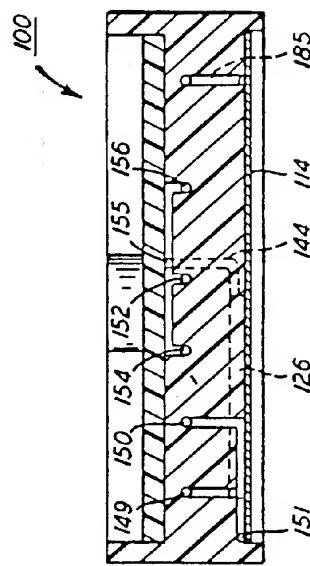
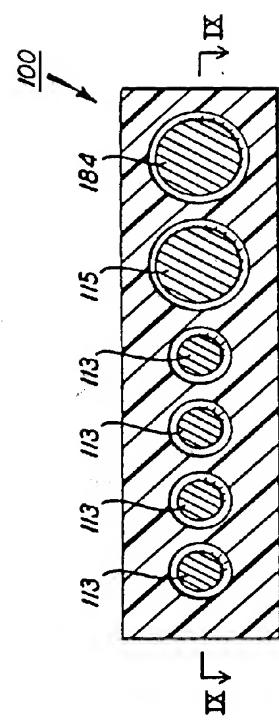
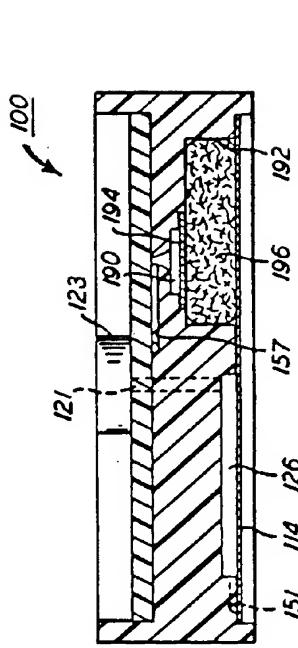
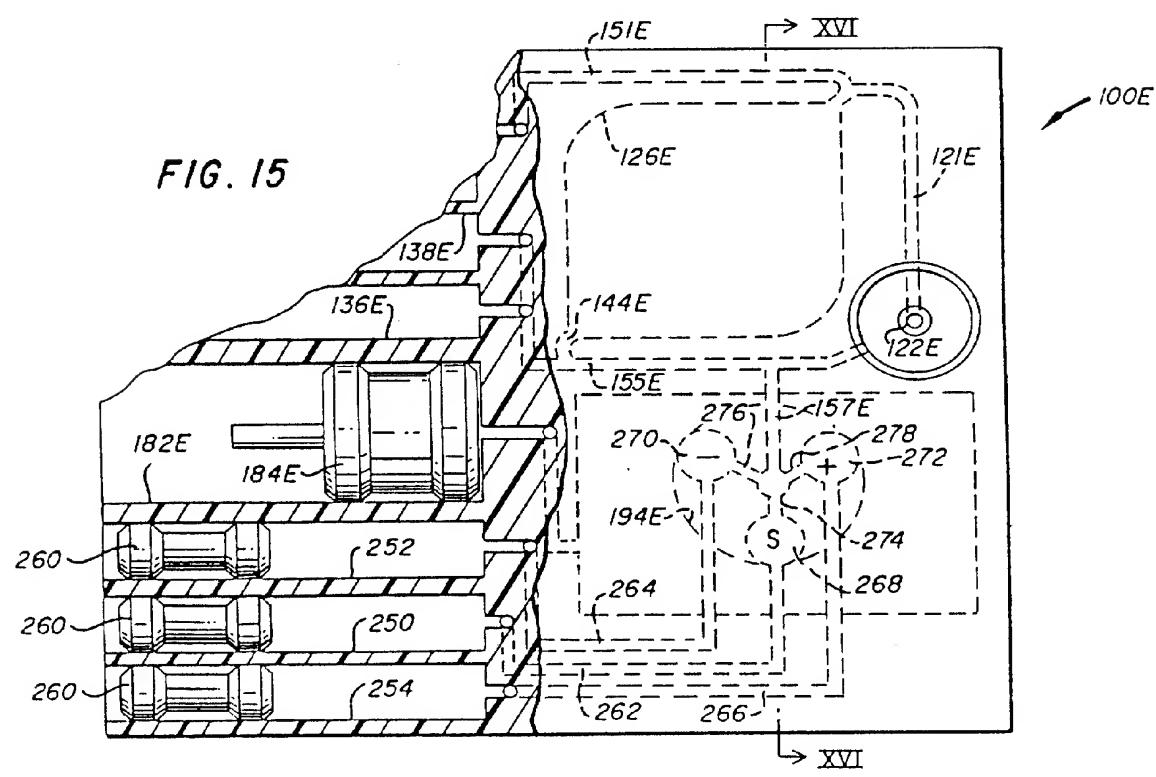
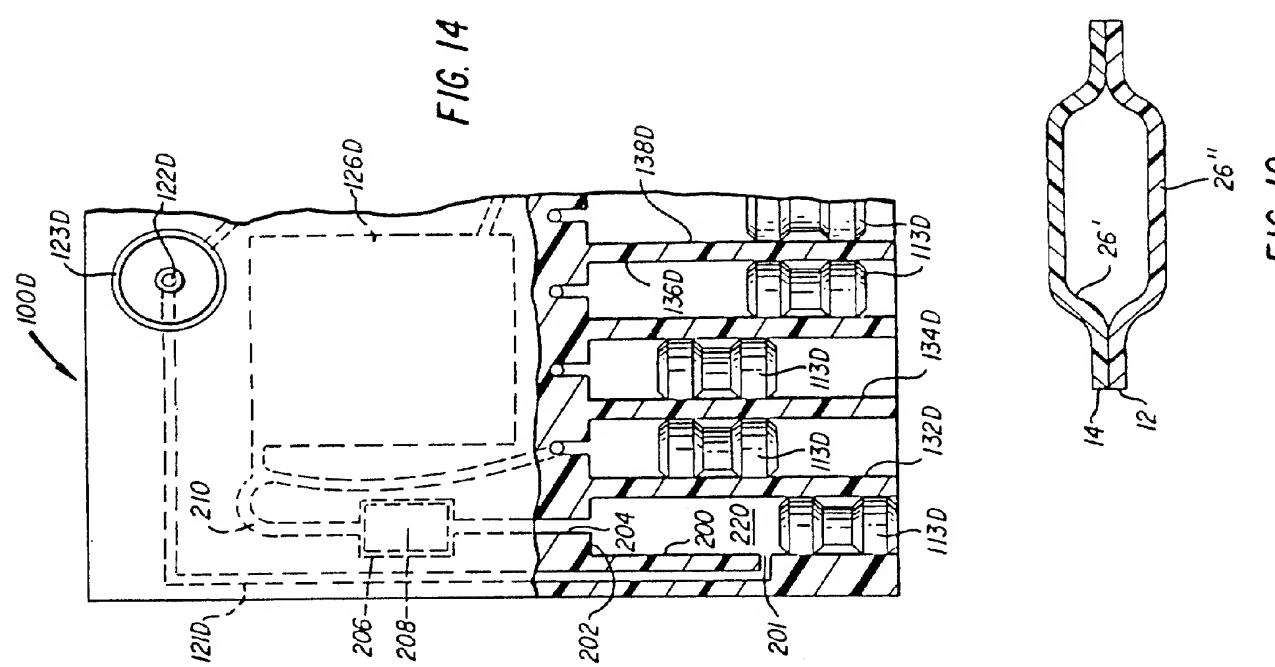


FIG. 8

FIG. 9







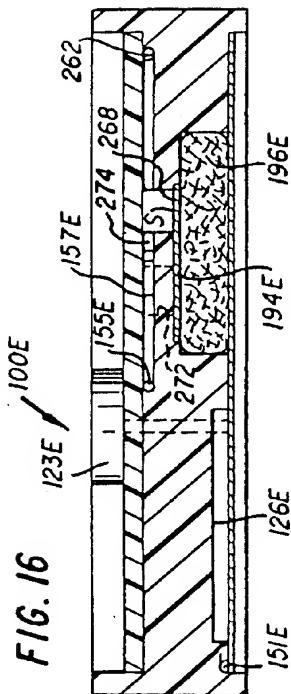


FIG. 16

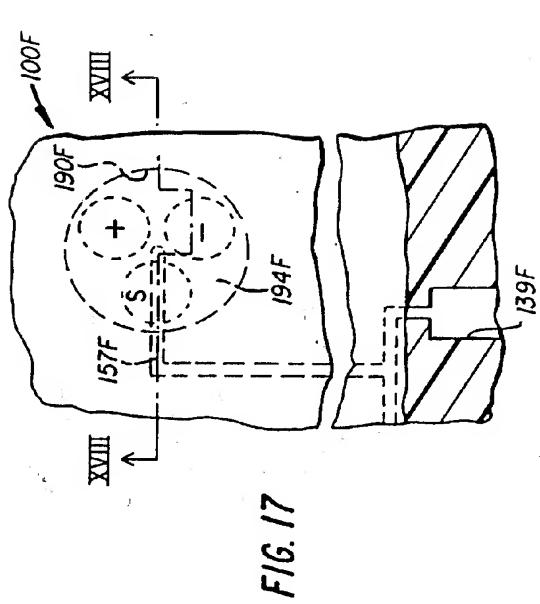


FIG. 17

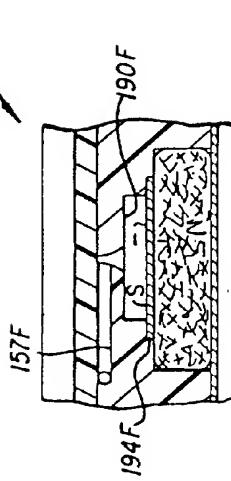


FIG. 18

第1頁の続き

- 優先権主張 ②1989年4月17日③米国(US)④339923
- ⑦発明者 チャールズ カリス アメリカ合衆国, ニューヨーク 14534, ピツツフォード, ラツチモア コート 23
- ヒンクリー
- ⑦発明者 ウィリアム ハロルド アメリカ合衆国, ニューヨーク 14615, ロチエスター, スワイート パーチ レーン 320
- ドニツシユ
- ドニツシユ
- ⑦発明者 ジョン ブルース フ アメリカ合衆国, ニューヨーク 14612, ロチエスター, クロスロード レーン 148
- インドレイ

手 続 補 正 書 (自 発)

平成 2 年 5 月 2 日

特許庁長官 吉 田 文 敏 殿

1. 事件の表示

平成 2 年 特許願第 22293 号

2. 発明の名称

PCR 用の封入キュベットおよびその使用方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 イーストマン コダック カンパニー

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目 8 番 10 号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士(6579)青木朗 之青弁
(外 4 名) 印領士

5. 補正の対象

(1) 明細書の「発明の詳細な説明」の欄

(2) 図面(第 1 図)

6. 補正の内容

(1) 発明の詳細な説明を以下の通り補正する。

① 明細書 32 頁 9 行目及び 11 行目の「44」を
「43」と補正する。② 明細書 33 頁 8 行目及び 18 行目の「62」を
「63」と補正する。③ 明細書 33 頁 19 行目の「角度」と「をなす
ように」との間に「(第 1 図の α 参照)」を挿入
する。

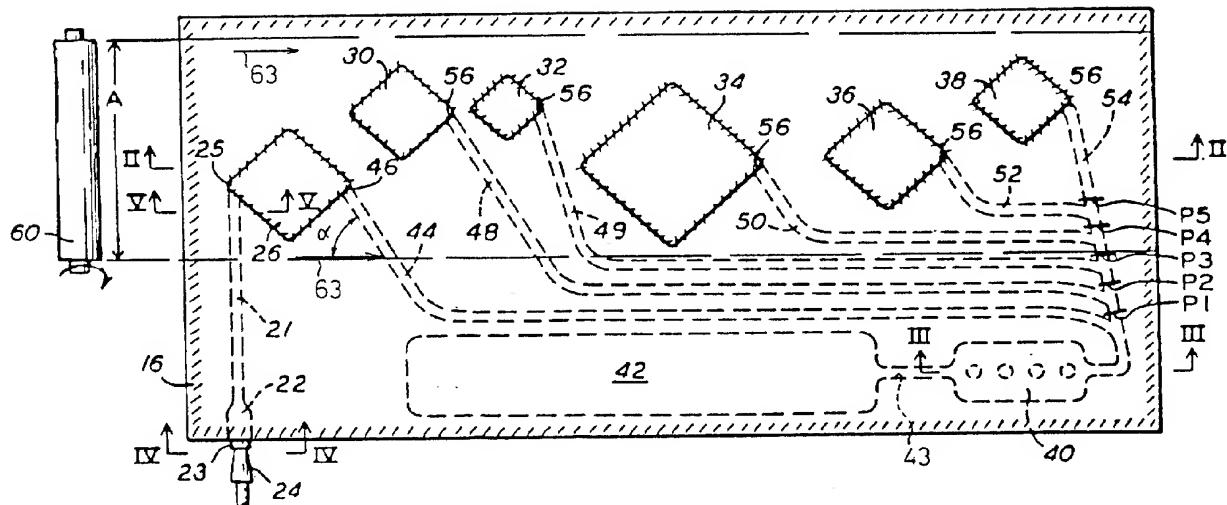
(2) 第 1 図を別紙の通り補正する。

6. 添付書類の目録

図面(第 1 図)

1 通

FIG. 1



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成6年(1994)7月12日

【公開番号】特開平3-7571

【公開日】平成3年(1991)1月14日

【年通号数】公開特許公報3-76

【出願番号】特願平2-22293

【国際特許分類第5版】

C12M 1/00 A 9050-4B

C12N 15/10

C12Q 1/68 A 7823-4B

手 続 補 正 書

平成5年 6月 10日

特許庁長官 麻 生 渡 殿

1. 事件の表示

平成2年特許願第22293号

2. 発明の名称

PCR用の封入キュベットおよびその使用方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 イーストマン コダック カンパニー

4. 代 理 人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話3504-0721

氏名 弁理士(6579)青木 朗 
(外4名)

5. 補正の対象

(1) 明細書の「特許請求の範囲」の欄

(2) 明細書の「発明の詳細な説明」の欄

6. 補正の内容

(1) 特許請求の範囲を別紙の通り補正する。

(2) 明細書10頁16行目の「90°」を「95°」と
補正する。

7. 添付書類の目録

特許請求の範囲 1通

2. 特許請求の範囲

1. 核酸材料の増幅および検出を実施するための閉鎖した、使い捨て型のキュベットにおいて、核酸材料と増幅試薬とを含有した反応室を含んだ複数の隔室と、約30°Cから約95°Cの範囲の温度を通じて前記反応室の内容物を能動的に若しくは受動的に循環せしめる手段と、少なくとも一つの検出材料と共に使用するように前記反応室に近接して位置する少なくとも一つの収納室と、圧力が反応室の内容物に印加されたときに前記隔室を所定の順序で相互に流体的に連結する手段とを具備しており、前記隔室は全てキュベットの外側の位置に対して流体に対して閉鎖されており、前記隔室の少なくとも一つはその中の検出地点において増幅の後の検出のため核酸材料を不動にするための手段を具備しており、増幅された核酸の検出を増幅された核酸材料による他のキュベットもしくは装置の汚染なしに行なうことができることを特徴とする使い捨て型の閉鎖キュベット。

2. 請求項1に記載の発明において、前記反応

る液体アクセス手段を具備し、(iv)サンプルDNAの注入の後にDNAの通過に対して前記キュベットを遮断する手段を具備し、更に少くとも検出材料およびDNAストランドを検出室および検出部位に移動する手段を具備し、一旦DNAサンプルが隔室に導入されアクセス開口が閉鎖されると、隔室内の流体内容物は運転者及び環境との接触が起らぬないように増幅期間及び検出反応の全期間は拘束されることを特徴とする装置。

5. 請求項4に記載の発明において、前記移動手段は前記キュベット中に取り付けられたピストンより成り、かつピストンは、該ピストンの移動時に前記検出材料及びDNAストランドをして前記検出地点に向け動くように付勢するべく構成される通路により連結されてることを特徴とする装置。

6. 請求項5に記載の発明において、前記移動手段は前記キュベット中に設けたピストンを更に具備し、該ピストンは通路によって前記検知地点に流体的に連結される第2のピストンを具備し、第2のピストンが収縮したときに前記検知地点で

室は核酸材料、ポリメラーゼ酵素、プライマー核酸およびニュークレオチドを具備していることを特徴とする使い捨て型の閉鎖キュベット。

3. 請求項1に記載の発明において、前記反応室は核酸材料、TAQポリメラーゼ、プライマー核酸およびニュークレオチドを具備していることを特徴とする使い捨て型の閉鎖キュベット。

4. DNAを増幅および検出する装置において、(1)複数の隔室と、これを少なくとも一つの他の隔室に相互に製造するための手段とを有するキュベットを有し、該キュベットは(a)DNAストランドを増幅するための少なくとも一つの反応室と、(b)増幅されたDNAを検出し、検出地点を具備する少なくとも一つの検出室と、(c)検出された材料を増幅されたDNAストランドに伝達する手段とを備え、(ii)約30°Cから約95°Cの温度範囲を通して反応室の内容物の積極的若しくは受動的な循環を許容する手段を具備し、(iii)増幅のためサンプルDNAを前記反応室に対する注入を許容するため、前記少なくとも一つの反応室にのみ連結され

る圧力を緩和することができる特徴とする装置。

7. 環境を汚染するエーロゾルが外部に流出することを許容することなしに閉鎖キュベットにおいて核酸材料を増幅しきつ検出する方法において、(a)核酸材料のサンプルをキュベットに注入し、該キュベットは、増幅試薬が存在する反応室と、検知材料と共に使用する収納室と、検知地点を含む少なくとも一つの室とを含む多数の隔室並びに流体の伝達を行わしめるため前記隔室を相互に連結する手段を具備し、(b)核酸材料を包含する前記キュベットの部分を恒久的に遮断し、全ての核酸をそのキュベットに封入し、(c)前記試薬が有効となる所定の温度変化にわたってキュベットを循環させることにより核酸材料を増幅し、(d)増幅された核酸材料を前記反応室から前記検知地点に流体的に搬送し、(e)検知材料を前記検知点に流体提供に搬送し、並びに(f)前記地点において増幅された核酸材料を前記検知材料と共に検出し、同時に核酸材料は前記キュベット中に封入維持す

ることを特徴とする閉鎖キュベット内の核酸材料
の増幅および検出方法。